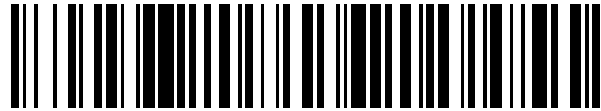


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 582**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2006 E 10182499 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2339348**

54 Título: **Procedimiento para diagnosticar una enfermedad neurodegenerativa**

30 Prioridad:

17.06.2005 GB 0512401

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.04.2015

73 Titular/es:

**RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
Ardmore, Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB**

72 Inventor/es:

**ZELLNER, MARIA y
OEHLER, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 582 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para diagnosticar una enfermedad neurodegenerativa

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

5 Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurodegenerativas están creciendo considerablemente. Los datos sugieren que los problemas de salud neuronales se encuentran entre los que más contribuyen a la carga global de enfermedades e incapacidades.

10 Los marcadores diagnósticos de los trastornos nerviosos son especialmente importantes para el diagnóstico precoz en el curso de la enfermedad, cuando los compuestos terapéuticos tienen más posibilidades de actuar, pero el diagnóstico exacto es difícil. Existen pocos marcadores diagnósticos para las primeras etapas de los trastornos neuronales; los que están disponibles se basan en el análisis de un material muestreado (p. ej., líquido cefalorraquídeo) que se obtiene con dificultad e infligiendo dolor. Por lo tanto, es de gran importancia la
15 caracterización de marcadores diagnósticos que sean detectables en la sangre periférica. Tales marcadores periféricos permitirían el cribado preventivo de una población de riesgo.

La enfermedad de Alzheimer es la causa principal de demencia en los países industrializados. En muy pocos casos se conocen unos antecedentes familiares claros, con mutaciones autosómicas sobre el gen del precursor de la proteína amiloide. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con enfermedad de Alzheimer no tienen antecedentes familiares obvios y se clasifican como enfermedad de Alzheimer esporádica. La causa de la enfermedad de
20 Alzheimer esporádica permanece desconocida en su mayor parte (Blennow K. y VanMechelen E, *J Neural Transm Suppl.* 1998; 53: 223-35).

En la actualidad, la enfermedad de Alzheimer se diagnostica principalmente por exclusión de otras causas conocidas de demencia. El diagnóstico en una fase precoz antes de los cambios irreversibles es virtualmente inexistente. Sin embargo, el tratamiento farmacéutico es probablemente más eficaz en las primeras fases de la enfermedad, antes
25 de que la neurodegeneración sea demasiado pronunciada y generalizada. Por lo tanto, hay una gran necesidad de marcadores diagnósticos mínimamente invasivos para el diagnóstico precoz de la evolución de la enfermedad.

Cattabeni et al. (2004. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28(5): 763-770) enseñan que la plaquetas expresan y procesan el precursor de la proteína amiloide (APP, por su nombre en inglés) de una manera parecida a lo observado en el cerebro.

30 En la solicitud publicada de patente de los EE. UU. US 2003/0064411 se describe la expresión reducida de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada con el número de acceso de SwissProt P78417 en los tejidos encefálicos de los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

Compendio de la invención

35 La presente invención se basa en la identificación de proteínas, aisladas de las plaquetas, que se pueden utilizar como marcadores para la enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer comprende la medición del nivel de expresión de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417 en una muestra de plaquetas aisladas de una persona que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer y determinar si los niveles de expresión están alterados en
40 comparación con un control, en donde un incremento del nivel de expresión de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417 en comparación con un control sano sin la enfermedad indica la presencia de la enfermedad de Alzheimer.

El diagnóstico implica el aislamiento de las plaquetas. En una realización preferida, las plaquetas no se deben activar durante la purificación de una muestra de sangre.

45 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, el uso de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en una persona que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer en un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el kit comprende una sonda que permite la identificación de una proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417 y los reactivos para un inmunoensayo, electroforesis bidimensional en gel o una reacción de la polimerasa
50 para detectar el nivel de expresión de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417.

Descripción de los dibujos

La invención se describe con referencia a los siguientes dibujos, en donde:

La figura 1 ilustra los niveles de activación celular para las plaquetas sin tratar, las plaquetas preparadas por cromatografía y las plaquetas preparadas por centrifugación; y

La figura 2 ilustra la técnica de la electroforesis diferencial en gel (DIGE).

5 Descripción detallada de la invención

Esta invención da a conocer procedimientos para diagnosticar la presencia, o el riesgo, de la enfermedad de Alzheimer basándose en la detección del nivel de expresión de una proteína específica, que se expresa en las plaquetas de una persona que se sospecha que tiene la enfermedad. El nivel de expresión de la proteína en las plaquetas se determina fuera del cuerpo (*ex vivo*) de la persona que se sospecha que tiene la enfermedad, en un ensayo *in vitro*. La proteína que se puede detectar para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer se recoge en la tabla 1. La columna «% de cambio» representa el incremento o disminución (número negativo) de la expresión relacionado con la enfermedad en comparación con un control sin enfermedad.

Tabla 1. Marcadores de la enfermedad de Alzheimer

N.º de acceso de SwissProt*	Nombre de la proteína	Variante	pI calculado	MM (kDa)	% de cambio EA/control
P78417	Glutación S- transferasa ω 1	Silvestre	6,19	30,2	39

* La base cognitiva de las proteínas de SwissProt es una base de datos de secuencias de proteínas anotadas establecida en 1986. La mantienen mediante colaboración el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Instituto de Bioinformática Europeo (EBI). La versión de SwissProt citada en la presente memoria es la v50.1, del 13 de junio de 2006. Se puede acceder a SwissProt en <http://expasy.ch> y en las páginas web del SIB y del EBI, www.isb-sib.ch y www.ebi.ac.uk, respectivamente. En Bairoch A. et al., *Brief Bioinform.* marzo de 2004; 5(1) 39-55 se ofrece una revisión de la base de datos SwissProt.

La tabla 1 indica el número de acceso de SwissProt para la proteína. Esto identifica el producto del ARNm que codifica la proteína.

La variante específica indicada en la columna 3 de la tabla 1 se utiliza de acuerdo con la invención. Más preferiblemente, la proteína tiene el pI (cuando se indica) y la masa molecular (MM) indicada en las columnas 4 y 5 de la tabla 1. La determinación de la MM de una proteína es un experimento convencional para el experto en la técnica, por ejemplo, se puede realizar mediante SDS-PAGE. La determinación del pI es también convencional para el experto en la técnica, mediante el uso de la técnica de isoelectroenfoque. El pI de la proteína en la tabla 1 se determinó mediante el programa informático de análisis bidimensional Decyder™ (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

El procedimiento requiere la detección del nivel de expresión de la proteína especificada a partir de las plaquetas de una persona, normalmente una persona que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer o una persona que se cree que tiene una predisposición a la enfermedad. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «nivel de expresión» se refiere a la cantidad de la proteína especificada (o del ARNm que codifica la proteína) en las plaquetas muestreadas. A continuación, el nivel de expresión se compara con el nivel de expresión de la proteína a partir de las plaquetas de control. El control puede ser una muestra de plaquetas de una persona que se sabe que tiene la enfermedad o una muestra de una persona que se sabe que no tiene la enfermedad. Será evidente para el experto en la técnica que comparar los niveles de expresión de un control y de la muestra problema permitirá tomar la decisión de si el nivel de expresión en la muestra problema y en el control son similares o diferentes y, por lo tanto, si el paciente tiene la enfermedad o corre el riesgo de padecerla. En la invención, la expresión de la proteína en la muestra problema se comparará con un control sano, a saber, sin enfermedad. La proteína puede tener el mismo o parecido incremento o disminución (en comparación con el control) de la expresión en comparación con la muestra problema. Si un incremento o disminución de la expresión es indicativo de la presencia de la enfermedad se indica en la sexta columna de la tabla 1, donde un valor negativo indica una disminución en la expresión.

Para despejar cualquier duda, un incremento del nivel de expresión (cuando se compara con un control sin enfermedad sano) del tipo silvestre de la glutación S-transferasa ω 1 indica la presencia, o el riesgo, de enfermedad de Alzheimer.

El control puede ser una muestra tomada de una persona que se sabe que está sana o que se sabe que está enferma (cuando sea necesario) y se puede analizar al mismo tiempo que la muestra problema. Sin embargo, es preferible que el control sea un valor, o un nivel de expresión, conocido que se sabe que es indicativo de una persona sana (o enferma). Una vez que se conoce este nivel de control, no se necesitan llevar a cabo pruebas de control cada vez que se analiza una muestra problema; la muestra simplemente se puede comparar con los valores de control conocidos.

Será evidente para la persona experta que se puede detectar la proteína completa, por ejemplo, la que se describe en la base de datos de SwissProt. Otra alternativa es que se puede identificar un fragmento (o número de fragmentos) siempre y cuando esto permita la identificación exacta de la proteína completa; por ejemplo, se utiliza por norma para identificar una proteína la digestión con proteasa de una proteína (completa) seguido de la espectrometría de masas de un número pequeño de los péptidos resultantes. Este procedimiento se utiliza a menudo para identificar un punto en un gel de proteínas. Si la proteína es un oligómero, la identificación de una sola cadena puede ser suficiente.

Los procedimientos para medir el nivel de expresión de una proteína de una muestra biológica se conocen bien en la técnica y se puede utilizar cualquier procedimiento adecuado. La proteína o el ácido nucleico de la muestra se puede analizar para determinar el nivel de expresión. Un ejemplo de un procedimiento adecuado es una PCR cuantitativa sobre el ARNm (o ADNc) obtenido de las plaquetas de muestra. El uso de la PCR cuantitativa para detectar los niveles de expresión génica se conocen bien en la técnica. Los kits para el análisis de expresión génica por PCR cuantitativa están disponibles en el mercado, por ejemplo, el sistema Quantitect fabricado por Qiagen. Se conoce bien en la técnica y también está dentro del alcance de la invención el análisis simultáneo de los niveles de expresión en muchas muestras utilizando un sistema de matrices de ácidos nucleicos basado en la hibridación.

El nivel de la proteína (o proteínas) concreta en una muestra se puede detectar directamente con una serie de técnicas que serán evidentes para el experto en la técnica. En resumen, las técnicas adecuadas típicamente implican poner en contacto la muestra que contiene potencialmente una proteína de la tabla 1 con una molécula de sonda que se fija específicamente a dicha proteína. Una etapa de lavado retira las moléculas sin fijar. A continuación se detecta la cantidad de moléculas de la sonda fijadas, con lo que se determina la cantidad de moléculas diana de la muestra. Preferiblemente, se marca la sonda para ayudar a la detección.

Para el análisis de un número relativamente pequeño de proteínas, se puede utilizar un inmunoensayo cuantitativo, tal como una transferencia Western o ELISA, para detectar la cantidad de la proteína (y, por lo tanto, el nivel de expresión) en una muestra.

Para analizar un número mayor de muestras a la vez, se puede utilizar una matriz de proteínas. Las matrices de proteínas se conocen bien en la técnica y funcionan de un modo parecido a las matrices de ácidos nucleicos, principalmente con proteínas inmovilizadas conocidas (sondas) para «capturar» una proteína de interés, por ejemplo, una proteína identificada en la tabla 1. Cuando la proteína es una enzima, se puede utilizar un ensayo enzimático para analizar la cantidad de enzima presente en una muestra. Una matriz de proteínas contiene muchas sondas proteicas inmovilizadas. Preferiblemente, la matriz contiene sondas proteicas con afinidad por diferentes proteínas diana, lo que permite analizar una serie de proteínas diferentes en la misma superficie de soporte, preferiblemente a la vez. Dos o más sondas moleculares con afinidad por una proteína identificada en la tabla 1 se pueden inmovilizar sobre un material de soporte adecuado para matriz de proteínas. Más preferiblemente, se pueden inmovilizar 3, 4, 5 o más sondas moleculares diferentes, por ejemplo, 10 o más. Las ventajas de esta multiplexación son que el análisis de varias muestras es más rápido y que es capaz de detectar muchos marcadores a la vez, lo que permite analizar combinaciones de marcadores, mediante lo cual se incrementa la exactitud diagnóstica. En la patente europea EP-A-0874242 se describe un material de soporte adecuado para ser usado en una matriz de proteínas. Una matriz de proteínas se puede analizar con el sistema Randox Evidence™, que está disponible en el mercado de Randox Laboratories Limited, Ardmore, Irlanda del Norte, Reino Unido.

Otra alternativa es que se puede utilizar la electroforesis bidimensional en gel para analizar simultáneamente el nivel de expresión de una serie de proteínas. Este procedimiento se conoce bien en la técnica; una muestra que contiene un gran número de proteínas se separa típicamente en una primera dimensión mediante isoelectroenfoque y en una segunda dimensión según el tamaño. Cada proteína reside en una única localización (un «punto») del gel resultante. La cantidad de proteína en cada punto y, por lo tanto, el nivel de expresión, se puede determinar mediante una serie de técnicas. Un ejemplo de una técnica adecuada es la tinción con plata del gel seguida del escaneo en un escáner Bio-Rad FX y el análisis asistido por ordenador con el programa informático MELANIE 3.0 (GeneBio). Otra posibilidad es que se utilice la electroforesis diferencial en gel (DIGE) para cuantificar el nivel de expresión (véase Von Eggeling et al., *Int. J. Mol. Med.* octubre de 2001; 8(4): 373-7). Esta técnica se resume en la figura 2.

Las plaquetas de la sangre son fragmentos de células sin núcleo implicadas en la coagulación de la sangre. Las plaquetas se pueden analizar directamente a partir de una preparación de sangre completa. Sin embargo, se prefiere que al menos se lleve a cabo cierta purificación para separar las plaquetas de otros componentes de la sangre. En una realización, una preparación de plasma se prepara a partir de una preparación de sangre completa y los niveles de expresión en las plaquetas se detectan directamente en el plasma. Los procedimientos para separar el plasma de otros componentes de la sangre se conocen bien en la técnica, por ejemplo, el plasma se puede preparar de sangre con anticoagulante mediante centrifugación. Las plaquetas se pueden purificar adicionalmente del plasma para que la preparación de plaquetas esté sustancialmente libre de otros componentes de la sangre. Esto normalmente requiere una centrifugación inicial suave a aproximadamente 200g para separar el plasma de los componentes leucocíticos y eritrocíticos de la sangre, y después una fuerte centrifugación a aproximadamente 2000g para separar las plaquetas del plasma. Preferiblemente, las plaquetas (que se han separado del plasma) se lisan a continuación y se obtiene un extracto de plaquetas. Los procedimientos para lisar células y obtener los extractos acelulares se conocen bien en la técnica.

La purificación de las plaquetas y los extractos de plaquetas de sangre completa mediante los procedimientos convencionales (que implican una fuerte centrifugación) a menudo conduce a la activación de las plaquetas. En particular, la etapa de centrifugación fuerte que se necesita para separar el plasma de las plaquetas conduce a la activación considerable de las plaquetas. La activación de las plaquetas es un fenómeno bien conocido que da lugar a la exocitosis de las vesículas y gránulos de secreción («desgranulación») junto con una serie de cambios bioquímicos adicionales y un cambio de forma. La activación a menudo conduce a la exocitosis de las proteínas de interés diagnóstico y, sin desear comprometerse con la teoría, disminuye el valor diagnóstico de las plaquetas obtenidas. Los ensayos para detectar el nivel de activación de las plaquetas en una muestra se conocen en la técnica. Se puede utilizar un ensayo de la protrombinasa o de agregometría de plaquetas, o se pueden detectar la expresión de los marcadores de activación, tales como la CD62-P (selectina P) y el factor 4 de las plaquetas, para medir la activación de las plaquetas, como resultará evidente para el experto en la técnica. La detección de CD62-P mediante citometría de flujo se describe en el ejemplo 1.

De acuerdo con la presente invención, se prefiere que las plaquetas a partir de las cuales se mide el nivel de expresión de una o varias proteínas estén sin activar. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «sin activar» o «inactivada» se refiere a las plaquetas que no se han activado con el procedimiento de purificación. Preferiblemente, las plaquetas están completamente inactivadas, aunque el experto en la técnica apreciará que las plaquetas que se han activado ligeramente mediante el procedimiento de purificación todavía pueden ser útiles. Preferiblemente, el nivel de activación de las plaquetas es del 50% o menos. Más preferiblemente, las plaquetas muestran una activación del 40% o menos, por ejemplo, del 30% o del 20%. Para despejar las dudas, el ejemplo 1 y la figura 1 muestran que las plaquetas preparadas de acuerdo con la presente invención muestran un nivel de activación de las plaquetas, que se mide mediante el % de células que expresan CD62-P detectadas mediante citometría de flujo, de aproximadamente el 20%, mientras que en las plaquetas preparadas de acuerdo con las técnicas convencionales se activan más del 60%.

En el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones se puede utilizar un procedimiento para aislar extractos de plaquetas sin activar de una muestra de sangre completa. Se ha encontrado que, si se evita una centrifugación fuerte durante la purificación de las plaquetas, se obtienen las plaquetas sin activar. Separar las plaquetas de los glóbulos rojos y de los glóbulos blancos por sedimentación o centrifugación suave seguido de la separación del plasma por filtración con exclusión por tamaños (en vez del procedimiento convencional que requiere una centrifugación fuerte) permite aislar los extractos de plaquetas sin activar. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «centrifugación fuerte» se refiere a las fuerzas de centrifugación utilizadas típicamente para sedimentar las plaquetas para su separación del plasma. La centrifugación fuerte típicamente requiere la centrifugación a 1000g o más, por ejemplo, 1500g o 2000g. «Centrifugación suave» se refiere a las fuerzas de centrifugación que no ocasionan la activación de las plaquetas. En una realización preferente, la centrifugación débil implica fuerzas de 500g o menos, más preferentemente de 250g o menos, por ejemplo, 100g o 50g. En la realización donde se utiliza la sedimentación para separar los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, se prefiere que, antes de la sedimentación, la muestra de sangre completa se diluya con un tampón isotónico, que puede contener aditivos para conseguir una densidad apropiada del plasma. Por ejemplo, la sangre (con anticoagulante) se puede mezclar con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la sedimentación. Otra posibilidad es que la sangre (con anticoagulante) se puede mezclar directamente con dextrano 500 (en PBS, p. ej., dextrano al 1,25%) a una concentración final de entre el 0,1% y el 5%, preferiblemente del 0,25%. dextrano) a una concentración final de entre el 0,1% y el 5%, preferiblemente del 0,25%.

El uso de la sedimentación para separar las muestras biológicas se conoce bien en la técnica y se puede utilizar cualquier procedimiento de sedimentación. Preferiblemente se utiliza la técnica de sedimentación con dextrano, en donde la muestra de sangre completa se aplica a una solución que contiene dextrano y a una densidad adecuada para separar las plaquetas y el plasma de otros componentes de la sangre (véase, por ejemplo, Bertoluzzo et al., 1999, *Blood Cell. Mol. Dis.* 25 (22): 339-349). Cuando se dejan reposar, el plasma y las plaquetas se separarán de otros componentes de la sangre, lo que forma un sobrenadante amarillento. Una ventaja de utilizar la sedimentación, en vez de la centrifugación suave, para separar las plaquetas de los glóbulos rojos y de los glóbulos blancos es que no se necesitará un equipo de centrifugación caro.

La sedimentación o la centrifugación suave de una muestra de sangre completa da lugar a un sobrenadante que contiene plaquetas y plasma. Aunque el sobrenadante se puede analizar directamente, se prefiere que se purifique adicionalmente para separar las plaquetas del plasma. Esta separación se lleva a cabo tradicionalmente sometiendo la suspensión de plaquetas (sobrenadante) a una etapa de centrifugación fuerte, que conduce a una activación sustancial de las plaquetas. Se ha encontrado ahora que evitar esta etapa de centrifugación fuerte permite preparar plaquetas sin activar. Preferiblemente, las plaquetas se separan del sobrenadante de la etapa de sedimentación mediante filtración por exclusión de tamaños, tal como la cromatografía en gel para exclusión por tamaños. El gel para exclusión por tamaños tiene una masa molecular de exclusión que es capaz de fraccionar o excluir las plaquetas para separarlas de los componentes del plasma. Los geles para exclusión por tamaños con límites de masa molecular adecuados resultarán evidentes para el experto en la técnica. Se prefiere que límite de la masa molecular sea de 40 MDa o mayor. Típicamente, el gel para exclusión por tamaños se empaqueta en una columna y la suspensión de plaquetas que se obtiene por la sedimentación o por la centrifugación suave de la muestra de sangre completa (p. ej., el sobrenadante de la etapa de sedimentación) se hace pasar por la columna, lo que proporciona un eluido inicial de la columna que contiene los componentes de masa molecular muy alta que han sido

excluidos por el gel para exclusión por tamaños y un eluido posterior de la columna que contiene los componentes de masa molecular más pequeña que han sido incluidos en el gel de cromatografía. Las plaquetas estarán presentes en la fracción excluida.

5 Para obtener un extracto, las plaquetas (a saber, la fracción excluida) se ponen en contacto con un agente de precipitación para lisar las plaquetas y precipitar las proteínas liberadas. Se puede utilizar también un agente de lisado distinto. Los agentes de lisado se conocen bien en la técnica y son normalmente detergentes. Se puede utilizar cualquier agente de precipitación, como se conoce bien en la técnica. Un agente de precipitación preferido es el etanol. Como agente de precipitación alternativo se puede utilizar el ácido tricloroacético (TCA, por su nombre en inglés). Preferiblemente, el primer eluido de la columna de la etapa de exclusión por tamaños (que contiene las plaquetas) se transfiere directamente desde la columna a un contenedor con la solución de precipitación. Una vez precipitadas, las macromoléculas del extracto de plaquetas permanecen estables durante un periodo prolongado de tiempo, incluso a temperatura ambiente.

Después de la precipitación, el precipitado se puede centrifugar para obtener un sedimento de proteínas precipitadas.

15 Por lo tanto, el procedimiento preferido para proporcionar el extracto de plaquetas sin activar comprende dos etapas principales, una primera etapa que es de sedimentación o de centrifugación suave, y una segunda etapa que es de exclusión por tamaños. La ausencia de centrifugación fuerte en estas dos etapas impide la activación de las plaquetas. En el ejemplo 1 se muestra esta técnica y en la figura 1 se ilustra su eficacia a la hora de preparar plaquetas sin activar, en comparación con las técnicas convencionales (basadas en la centrifugación).

20 Una vez que se han lisado las plaquetas sin activar, lo que proporciona un extracto sin activar, se pueden utilizar otras etapas que implican la centrifugación, por ejemplo, para obtener un sedimento de proteínas precipitadas.

El precipitado de proteínas producido por este procedimiento se vuelve a solubilizar preferiblemente en una solución acuosa antes de un procedimiento de análisis.

25 El procedimiento para proporcionar plaquetas sin activar se utiliza preferiblemente para producir extractos de plaquetas que contienen una proteína, o una combinación de proteínas, que se recoge en la tabla 1. Un ensayo para cuantificar la cantidad de cualquier proteína identificada en la tabla 1 presente en una muestra de sangre comprende, por lo tanto, obtener un extracto de plaquetas sin activar como se describe más arriba y determinar la cantidad de la proteína precipitada producida, como se describe más arriba.

30 La utilización de un kit que comprende los medios para realizar cualquier aspecto de la invención para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 se encuentra dentro del alcance de la invención. El kit comprende una sonda que permite la identificación de la proteína de la tabla 1. Preferiblemente, la sonda es específica de la proteína identificada en la tabla 1. Se puede utilizar cualquier sonda que identifica de forma específica la presencia de la proteína. El experto en la técnica se dará cuenta de que la detección de la cantidad de una sonda fijada permite determinar la cantidad de la molécula diana. Preferiblemente, la sonda se marca con una marcación detectable. Las marcaciones detectables adecuadas serán evidentes para el experto en la técnica e incluye marcaciones radioactivas, marcaciones quimioluminiscentes y marcaciones bioluminiscentes. Tal y como se indica más arriba, las sondas se pueden inmovilizar en una matriz, para permitir la multiplexación.

35 En una realización preferida, la sonda es una molécula de anticuerpo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, a la terminología anticuerpo se le dará su significado estándar en la técnica, a saber, una molécula de inmunoglobulina. El experto en la técnica se dará cuenta de que se puede utilizar cualquier tipo de molécula de inmunoglobulina o fragmento de la misma, siempre y cuando conserve la capacidad de fijarse a la molécula diana especificada. Los fragmentos de anticuerpo preferidos incluyen moléculas Fab y scFv. Los anticuerpos recombinantes y los anticuerpos monoclonales se encuentran dentro del alcance de la invención. Cuando la sonda es un anticuerpo, se utiliza preferiblemente un inmunoensayo cuantitativo para detectar la presencia del anticuerpo fijado a la proteína diana de la tabla 1 y, de esta forma, el nivel de expresión de esa proteína diana. Los inmunoensayos tales como las transferencias Western o ELISA, y los reactivos necesarios para realizar tales inmunoensayos, se conocen bien en la técnica. El kit puede contener todos los reactivos necesarios para realizar el inmunoensayo. En una realización preferida alternativa, la sonda es un ácido nucleico que puede hibridarse a un ácido nucleico, preferiblemente ARNm, que codifica la proteína identificada en la tabla 1. En esta realización, el kit contiene preferiblemente los reactivos, tales como los cebadores y una enzima polimerasa, que son necesarios para realizar una reacción de la polimerasa, preferiblemente una reacción de la polimerasa cuantitativa que (tal y como se describe más arriba) se puede utilizar para detectar el nivel de expresión de una proteína.

40 La sonda puede ser un aptámero. Tal y como se utiliza en la presente memoria, a la terminología «aptámero» se le da su significado estándar en la técnica, a saber, un oligonucleótido que se fija a una molécula diana. De acuerdo con presente invención, el aptámero se fija a la proteína identificada en la tabla 1.

El nivel de expresión de la proteína se puede determinar mediante electroforesis bidimensional en gel, o mediante DIGE, como se indicó más arriba. En esta realización, el kit comprende los reactivos necesarios para identificar la proteína identificada en la tabla 12, mediante el uso de estas técnicas.

En una realización se puede utilizar un kit para realizar el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones para preparar plaquetas sin activar. Preferiblemente, este kit comprende un agente de sedimentación, un dispositivo de filtración y un agente de precipitación. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «agente de sedimentación» se refiere a un reactivo que se puede utilizar para separar el plasma sanguíneo de la sangre anticoagulada, mediante la sedimentación a través del agente de sedimentación. Un agente de sedimentación preferido es el dextrano (tal y como se describe más arriba). Un «dispositivo de filtración» se refiere a un dispositivo que separa las plaquetas del plasma. Un dispositivo de filtración preferido es una columna para exclusión por tamaños, lo más preferiblemente con un límite de M_r de 40 MDa o más. Un «agente de precipitación» es como se define más arriba.

La invención se describe además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

(a) Se obtuvieron muestras de sangre de individuos normales y se trataron con el tampón de dilución para demostrar que resulta eficaz la retirada de los glóbulos rojos y blancos de acuerdo con la presente invención.

Sangre anticoagulada (4 ml) que se utilizó como control se diluyó 1:1,25 con una solución salina isotónica tamponada con fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ a 10 mM, pH = 7,4, NaCl a 135 mM, KCl a 2,7 mM, EDTA a 5 mM) y se dejó reposar durante 50 minutos. Los 100 μl superiores del sobrenadante amarillento se analizaron en un hemocitómetro (Coulter MicroDiff 18, Beckmann-Coulter, FL). El sobrenadante contenía 395×10^3 plaquetas/ μl , $0,03 \times 10^6$ glóbulos rojos/ μl y $3,4 \times 10^3$ glóbulos blancos/ μl . Antes de la sedimentación, la sangre contenía 187×10^3 plaquetas/ μl , $5,7 \times 10^6$ glóbulos rojos/ μl y $4,3 \times 10^3$ glóbulos blancos/ μl . Así pues, se retiraron aproximadamente el 98% de los glóbulos rojos y el 21% de los glóbulos blancos mediante la etapa de sedimentación. El sobrenadante contiene plaquetas con una pureza de más del 92%. Las otras células que quedan son glóbulos rojos (7%) y glóbulos blancos (1%), que consisten principalmente en linfocitos.

La retirada de sólo los 3/4 superiores del sobrenadante mejora la reducción de los glóbulos blancos en la etapa de sedimentación. Un sobrenadante típico preparado a partir de sólo los 3/4 superiores contiene el 97,4% de plaquetas, el 1,8% de glóbulos rojos y el 0,8% de glóbulos blancos. La concentración de células en la muestra de sangre completa/sobrenadante fue de: glóbulos rojos $5,0 \times 10^6/\mu\text{l}$ / $2,0 \times 10^3/\mu\text{l}$; glóbulos blancos $4,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ / $0,9 \times 10^3/\mu\text{l}$; plaquetas $322 \times 10^3/\mu\text{l}$ / $108 \times 10^3/\mu\text{l}$. El 99,6% de los glóbulos rojos y el 80,8% de los glóbulos blancos se retiran por sedimentación y la retirada de los 3/4 superiores del sobrenadante.

(b) A continuación, el sobrenadante que contiene las plaquetas se trató con un gel para exclusión por tamaños para demostrar la eficacia de retirar las proteínas plasmáticas de acuerdo con la presente invención, como se detalla a continuación.

Se compró a Amersham-Pharmacia la Sepharose 2B, un gel de agarosa que tiene un fraccionamiento de masa molecular de aproximadamente 80 MDa. Aproximadamente 15 ml del gen se lavaron con la solución salina tamponada con fosfato (PBS), se desgasificó, se empaquetó en una pequeña columna de 12 cm con un diámetro de 1,4 cm, y se lavó con PBS. El exceso del tampón se drenó desde la parte superior de la columna y se aplicaron 200 μl del sobrenadante con plaquetas en la parte superior del gel sin alterar la superficie del gel. Después de que entraran completamente los 200 μl en el lecho de gel, se añadieron 15 ml de PBS escalonadamente (de 1 ml en 1 ml) a la columna con el gel empaquetado. Cada mililitro del eluyente se recogió y dividió en 3 partes: una parte se utilizó para determinar en un hemocitómetro el número de plaquetas, la segunda se utilizó para determinar la concentración de proteínas de acuerdo con el protocolo de Bradford estándar, y la tercera parte se utilizó para estudiar las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Las plaquetas contenidas en el sobrenadante se eluyeron al principio en aproximadamente 3 ml. Sin embargo, las proteínas plasmáticas se eluyen mucho más tarde, a aproximadamente 8 ml. El análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE reveló que la proteína plasmática principal, la albúmina, se eluía entre 8 ml y 19 ml, y estaba ausente en las fracciones de plaquetas. Estos datos muestran que la aplicación del sobrenadante que contiene las plaquetas de la sangre sedimentada a la cromatografía en gel para exclusión por tamaños conduce a la retirada de las proteínas plasmáticas. También se observó que los glóbulos blancos que quedaban en el sobrenadante se separaron de las plaquetas durante la cromatografía de exclusión por tamaños; se observó una fijación inespecífica de los glóbulos blancos a la Sepharose, lo que retrasa su elución.

(c) A continuación, las proteínas plaquetarias preparadas se analizaron por electroforesis bidimensional en gel y se comparó con las proteínas plaquetarias preparadas por centrifugación, como se describe a continuación.

El eluido preparado más arriba, que contenía las plaquetas sin activar, se precipitó en etanol.

Para el aislamiento por centrifugación, la sangre periférica se centrifugó a 50g durante 15 minutos. El sobrenadante contenía plasma rico en plaquetas (PRP). En presencia de PGE1 (prostaglandina E1) a 150 nM, el PRP se sometió a una segunda centrifugación (fuerte) a 1500g durante 15 minutos. A continuación, el sedimento de plaquetas se

lavó dos veces en tampón isotónico y se precipitó en etanol.

El precipitado de cada preparación se sedimentó por centrifugación a gran velocidad y se volvió a solubilizar en un tampón acuoso con urea a 8 M. El patrón de las proteínas de ambos grupos de tratamiento se analizó mediante electroforesis bidimensional en gel de acuerdo con Gerner et al. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 39018-26.

5 Ambas preparaciones de proteínas plaquetarias contenían varios cientos de proteínas. Sin embargo, la preparación de proteínas de las plaquetas centrifugadas contenían también otras proteínas de bajo peso molecular, que se identificaron como proteínas plasmáticas. Estos resultados muestran que la presente invención produce una preparación de proteínas plaquetarias de gran calidad, lo que es adecuado para los estudios de proteómica, y que no está contaminada con proteínas plasmáticas.

10 (d) Finalmente, se midió la expresión del marcador de activación CD62P (selectina P) en las plaquetas preparadas como se describe más arriba y se comparó con las plaquetas preparadas por centrifugación. Se utilizó sangre sin tratar como control negativo. El grado de activación de las plaquetas se determinó mediante la expresión del marcador de activación específico CD62P medido por citometría de flujo.

15 Las plaquetas filtradas en gel muestran los mismos niveles bajos de expresión de CD62P que las plaquetas en la sangre sin tratar, mientras que las plaquetas preparadas por centrifugación mostraron un fuerte incremento del nivel de expresión. Incluso la única etapa de centrifugación que produce plasma rico en plaquetas (PRP) conduce a un pequeño incremento de la expresión de CD62P. Estos datos se ilustran en la figura 1, que ilustra que la preparación de los extractos de plaquetas de acuerdo con la presente invención da lugar a una reducción enorme del nivel de activación de las plaquetas en comparación con el procedimiento de purificación convencional.

20 Ejemplo 2

2.1 Selección de los pacientes

2.1.1 Control sano

25 Para este estudio se seleccionaron al menos un número correspondiente de controles emparejados por edad y sexo que no presentaban indicios de trastorno neuropsiquiátrico ni de disfunción cognitiva. Los sujetos de control tenían un perfil clínico estandarizado basado en las exploraciones neurológicas, análisis bioquímicos de sangre y orina, y evaluación neuropsicológica.

2.1.2 Evaluación de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer

30 Un diagnóstico fiable de la EA es, hasta la fecha, solamente posible mediante un análisis del cerebro en una autopsia. Sin embargo, hay algunos parámetros que señalan la enfermedad. Por lo tanto, era importante evaluar concienzudamente a los pacientes que debían participar en el estudio. Se estudiaron los pacientes en las primeras etapas de la demencia. Estos pacientes se supone que padecen la EA según se determinaba mediante evaluaciones médicas, epidemiológicas y neuropsicológicas. Para la posterior corroboración, se tomaron plaquetas de sangre aislada de estos pacientes y se analizó por transferencia Western la expresión y el patrón de fragmentos del precursor de la proteína β -amiloide (APP). La proporción de los dos fragmentos de la APP se sabe que cambia en el transcurso de la enfermedad de Alzheimer (Di Luca et al., 1998, *Arch. Neurol.* 55: 1195-1200). La proporción de los APP de los pacientes en las primeras etapas de la demencia no se distinguía de la de los controles sanos.

40 La proporción normal de los APP encontrada en los pacientes en las primeras etapas de la demencia pueden indicar que los pacientes podrían padecer un trastorno neurodegenerativo que es diferente a la EA, o bien que se debe al tratamiento médico recibido. Los pacientes se trataron con un inhibidor de la acetilcolinesterasa, que recientemente se describió que abolía cualquier cambio de la proporción de los APP que pueda inducir la enfermedad cuando haya EA. Así pues, los pacientes en las primeras etapas de la demencia no son adecuados para el estudio.

45 Para encontrar un grupo de pacientes más prometedor, se inspeccionaron los pacientes en las últimas etapas de la demencia. Un estudio publicado recientemente demostró mediante el análisis en la autopsia que el grupo de pacientes en las últimas etapas de la demencia consiste en 70% con EA, 15-20% demencia con cuerpos de Lewy y 2-8% con demencia hipóxica vascular (Jellinger, 2001, *J. Neural Neurosurg. Psychiatry.*, noviembre de 2001; 71: 707-8). Además, estos pacientes no recibieron inhibidores de la acetilcolinesterasa ni otros tratamientos que se sabe que interfieren con las plaquetas. Así, los pacientes en las últimas etapas de la demencia parecían ser el mejor grupo de pacientes para el estudio.

50 Para reducir el número de falsos positivos (30%) en los pacientes en las últimas etapas de la demencia, se analizó la proporción de los fragmentos del precursor de la proteína amiloide (APP) de estos pacientes y se comparó con la proporción de los APP de los sujetos de control emparejados por edad y sexo. A simple vista, dos grupos de proporciones de APP se podían diferenciar en ambos grupos de estudio a partir del análisis por transferencia Western de las proteínas plaquetarias de todas las muestras recogidas. La mayoría de los sujetos de control (n = 13) tienen una proporción elevada de APP. Esto concuerda con la bibliografía. Ocho sujetos de control tenían una proporción de APP baja.

55

En 14 de los 21 pacientes con demencia, la proporción entre las isoformas de 130 y de 106-110 kDa era marcadamente pequeña, lo que se corresponde con lo descrito para la enfermedad de Alzheimer. La proporción de APP de los 7 pacientes restantes eran tan altas como las proporciones de los sujetos de control, lo que sugiere que estos pacientes tendrían otras formas de demencia. Esta proporción es similar al primer resultado del estudio anatomopatológico, ya que los siete pacientes con demencia excluidos con una proporción de APP alta eran equivalentes al 30% de las demencias que no son alzhéimer.

Luego se midió la densidad óptica de las bandas de APP de los cuatro grupos y se calcularon las proporciones. La selección visual se confirmó mediante estas mediciones. Se fijó en 1,2 el nivel de corte para las proporciones de APP pequeñas. De los 21 pacientes con demencia, 14 tenían una proporción de APP por debajo de este nivel de corte, y el valor medio era de $1,06 \pm 0,21$ ($n = 14$). Este grupo tenía una alta probabilidad de EA y se utilizó en el ensayo proteómico. De los 21 controles sanos emparejados por edad, 13 mostraron una proporción de APP por encima de 1,2, con un valor medio de $1,44 \pm 0,21$ ($n = 13$). Estos voluntarios era muy probable que no tuvieran problemas de EA, incluso en las primeras etapas, y se utilizaron como control.

La edad media del grupo con demencia clasificado para el grupo de estudio del alzhéimer era de $82,8 \pm 5,8$ y la edad media del grupo de control con proporciones elevadas de APP era $81,7 \pm 6,1$.

2.2 Preparación de la muestra

2.2.1 Elección del material de muestra

Las plaquetas son glóbulos rojos sin núcleo que tienen una función esencial en la coagulación de la sangre. Se espera que los mecanismos reguladores postranscripcionales desempeñen una función importante en los cambios específicos de la enfermedad. Por lo tanto, se adoptó una estrategia proteómica y se estudiaron los cambios específicos que la enfermedad provocaba en la cantidad de proteínas.

2.2.2 Toma de muestra de sangre

Se tomó sangre venosa periférica sin estasia y se inhibió la coagulación con citrato. Las plaquetas se prepararon inmediatamente después de extraer la sangre.

2.2.3 Preparación de las plaquetas

Para evitar toda activación y desgranulación de las plaquetas, la preparación de las proteínas de las plaquetas de sangre humana se llevó a cabo sin centrifugar inmediatamente después de que se tomase la muestra de sangre en el hospital. La separación de las plaquetas de otros componentes de la sangre se produjo en dos etapas: (1) retirada de los glóbulos rojos y blancos por sedimentación, y (2) separación de las plaquetas de otros componentes del plasma mediante cromatografía por exclusión de tamaños.

2.2.4 Electroforesis bidimensional en gel

El precipitado de proteínas plaquetarias se solubilizó en el tampón de muestra que contiene urea, tiourea y CHAPS, y se aplicó en la primera dimensión para el isoelectroenfoque (tiras de Immobiline Dry de 24 cm a un pH que oscila de 4-7 y 6-9). Esto conduce a una separación de las proteínas de acuerdo a su pl. A continuación, la tira de IPG (gradiente del pH inmovilizado) se aplicó en la 2.^a dimensión en un gel de SDS-PAGE al 11% y las proteínas se separaron por su masa molecular. Los puntos de las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Los geles se escanearon en un escáner FX de Bio-Rad, y se analizaron las imágenes con el programa informático de imágenes MELANIE 3,0 de GeneBio. Con el sistema de electroforesis diferencial bidimensional en gel con fluorescencia (DIGE), las muestras de proteínas plaquetarias se marcaron con el colorante de fluorescencia antes de la electroforesis y los geles bidimensionales se escanearon con un escáner Typhoon (Amersham Biosciences).

Las imágenes de los geles eran muy reproducibles. Por ejemplo: en cuatro geles en paralelo de las mismas muestras se detectaron 2463, 2645, 2710 y 2487 puntos de proteínas, respectivamente. Esto indica un coeficiente de variación muy bajo, de sólo el 4,7%. Sin embargo, algunos puntos eran muy débiles y, por lo tanto, no eran adecuados para un posterior análisis. Teniendo en cuenta sólo los puntos independientes y claros, se encontraron 1983 puntos (77%) presentes en los cuatro geles. Esta reproducibilidad se encuentra a un nivel similar a lo publicado por otros grupos de investigación proteómica (por ejemplo, O'Neill et al., 2002, «Towards complete analysis of the platelet proteome», *Proteomics*, 2 288-305).

2.3 Enfermedad del Alzheimer

Para determinar si las plaquetas de los pacientes con EA tienen modificaciones específicas de su perfil de expresión de proteínas, se tuvieron que superar las variaciones entre individuos. Por lo tanto, se eligió una estrategia de dos etapas:

1. Análisis en geles bidimensionales de muestras agrupadas de pacientes con EA (esto equilibra las diferencias entre individuos) para conseguir una panorámica de las diferencias específicas de la enfermedad y conseguir una lista de los puntos candidatos.

2. Análisis bidimensionales en gel de cada uno de los pacientes para evaluar la significación estadística de los puntos candidatos.

5 Con el programa informático MELANIE 3.0, se compararon los geles 2 x 2 de EA y se calculó una imagen sintética de la EA que contenía todos los puntos comunes (1925). La imagen sintética de control correspondiente tenía 1983 puntos comunes. Una comparación de estos dos geles sintéticos reveló que 1501 puntos estaban presentes tanto en las muestras de control como en las de EA. Los aproximadamente 400 puntos que no eran comunes eran todos muy débiles y probablemente se debieran a variaciones metodológicas. Los 1501 puntos comunes se introdujeron en una evaluación estadística. Se calculó la media del nivel de expresión de cada uno de los puntos del grupo de EA y se comparó con la media del grupo de control sano. Además, el nivel de significación de las diferencias se calculó mediante una prueba *t* de Student.

10 Con esta estrategia se encontró que 72 puntos de proteínas mostraban un incremento o disminución significativo ($p < 0,05$) de la intensidad de los puntos de las muestras de EA en comparación con el control sano. Para evaluar la especificidad de estos 72 puntos, el nivel de expresión de estos puntos se analizó en geles bidimensionales de cada uno de los pacientes con EA y cada uno de los controles.

15 Con los 20 valores de intensidad de cada punto por grupo se calculó el valor medio junto con la prueba de la *t* de Student. Se encontró que 25 puntos seguían siendo estadísticamente significativos (véase la tabla 1).

2.3.1 Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas a partir de los puntos de proteínas relacionadas con el alzhéimer

A partir de este estudio se identificaron veinticinco proteínas. Las proteínas se recogen en la tabla 1.

20 3. Conclusión

Los experimentos detallados en la presente memoria indican que la proteína identificada en la tabla 1 es un marcador útil para la presencia de la enfermedad de Alzheimer, o el riesgo de desarrollar dicha enfermedad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende la medición del nivel de expresión de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417 en una muestra de plaquetas aisladas de una persona que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer, y determinar si el nivel de la expresión está alterado en comparación con un control, en donde un incremento del nivel de expresión de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417 cuando se compara con un control sano sin enfermedad indica la presencia de la enfermedad de Alzheimer.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la detección de la expresión de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada del número de acceso de SwissProt P78417 se lleva a cabo en una muestra de plasma.
3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las plaquetas se purifican para estar sustancialmente libres de otros componentes de la sangre.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las plaquetas están sin activar.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el nivel de expresión en las plaquetas de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417 se determina a partir de un extracto de proteínas plaquetarias.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde un extracto de proteínas plaquetarias se aísla de una muestra de sangre con un procedimiento que comprende las etapas de:
 - (i) retirar los glóbulos rojos y blancos de la muestra mediante sedimentación o centrifugación suave;
 - (ii) retirar las plaquetas de la muestra resultante;
 - (iii) poner en contacto las plaquetas obtenidas en la etapa (ii) con un agente para lisar las plaquetas y precipitar el extracto de proteínas plaquetarias;
 - 25 (iv) opcionalmente, centrifugar el lisado resultante para obtener las proteínas precipitadas.
- 30 7. Utilización de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en una persona que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer según un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el kit comprende una sonda que permite la identificación de una proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417 y los reactivos para un inmunoensayo, electroforesis bidimensional en gel o una reacción de polimerasa para detectar el nivel de expresión de la proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417.
8. Utilización de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la sonda se fija específicamente a una proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417.
9. Utilización de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la sonda es un anticuerpo o un aptámero.
- 35 10. Utilización de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la sonda es un ácido nucleico que se hibrida a un ARNm que codifica una proteína de la glutatión S-transferasa de tipo silvestre identificada por el número de acceso de SwissProt P78417.

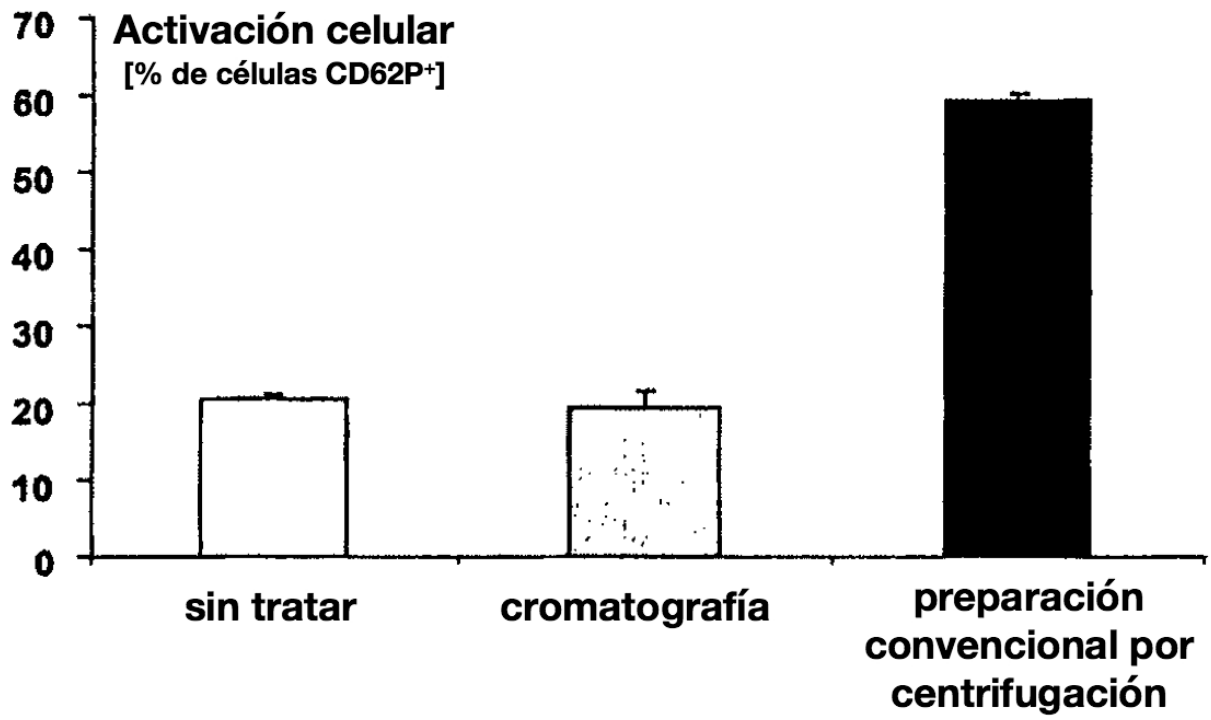


Figura 1

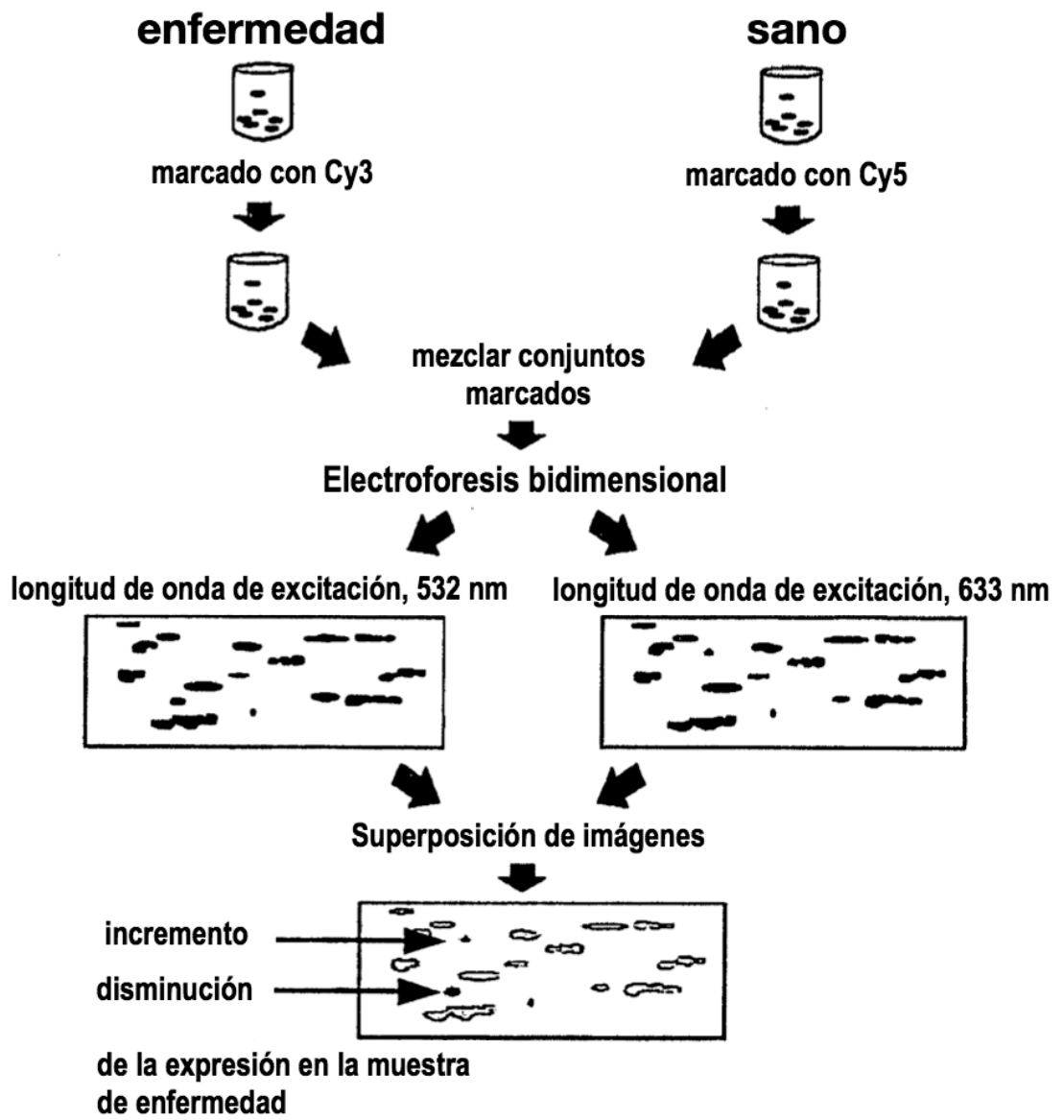


Figura 2